

(12)

DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

(21) Numéro de dépôt: 86402014.4

(22) Date de dépôt: 15.09.86

(51) Int. Cl.⁴: C 07 F 9/09
 C 07 F 9/58, C 07 H 19/06,
 C 07 H 19/16,
 C 12 N 11/02, C 12 N 11/14

(50) Priorité: 17.09.85 FR 8513740

(43) Date de publication de la demande:
 15.04.87 Bulletin 87/16

(54) Etats contractants désignés:
 AT BE CH DE FR GB IT LI LU NL SE

(71) Demandeur: INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE
 LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM)
 101, rue de Tolbiac
 F-75006 Paris Cedex 13 (FR)

(72) Inventeur: Previero, Aldo
 Mas de la Droleta Rue du Père Prévost
 F-34100 Montpellier (FR)

Pugniero, Martine
 1 Grand Rue, Clapiers
 F-34170 Castelnau Le Lez (FR)

Previero, Maria-Antonia
 Mas de la Droleta Rue du Père Prévost
 F-34100 Montpellier (FR)

(74) Mandataire: Orès, Bernard et al
 Cabinet ORES 6, avenue de Messine
 F-75008 Paris (FR)

(54) Procédé d'insolubilisation d'enzymes par fixation sur des complexes alumine-phosphates organiques et enzymes insolubilisées obtenues par ce procédé, nouveaux supports d'enzymes et leur procédé de préparation et application desdites enzymes insolubilisées.

(57) Nouveau complexe solide formé par de l'alumine liée à un composé bi- ou polyfonctionnel contenant au moins un groupe fonctionnel phosphate et au moins un groupe chimiquement réactif capable de former une liaison covalente avec des composés protidiques et notamment des enzymes. Procédé de préparation de ce complexe.

Procédé de préparation d'enzymes insolubilisées qui consiste à former un corps complexe dans lequel une enzyme est liée par liaison covalente au complexe solide susdit, qui joue le rôle de support de l'enzyme; enzymes insolubilisées obtenues par ce procédé.

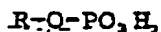
Applications du complexe: en tant que support de fixation de composés protidiques et en tant que moyen pour l'isolement et/ou le dosage de phosphates organiques contenus dans un milieu biologique.

Application des enzymes insolubilisées pour la catalyse de synthèses peptidiques.

Description

**PROCEDE D'INSOLUBILISATION D'ENZYMES PAR FIXATION SUR DES COMPLEXES
ALUMINE-PHOSPHATES ORGANIQUES ET ENZYMES INSOLUBILISEES OBTENUES PAR CE PROCEDE,
NOUVEAUX SUPPORTS D'ENZYMES ET LEUR PROCEDE DE PREPARATION ET APPLICATIONS DESDITES
ENZYMES INSOLUBILISEES**

- 5 La présente invention est relative à un procédé d'insolubilisation d'enzymes par fixation sur des complexes alumine-phosphates organiques et aux enzymes insolubilisées obtenues par ce procédé ; elle est également relative aux nouveaux supports d'enzymes, insolubles, et à leur procédé de préparation ; elle est d'autre part relative aux applications des enzymes insolubilisées ainsi préparées.
- 10 La fixation d'enzymes à des supports insolubles constitue une étape clé en ce qui concerne la plupart des procédés de bioconversion dans le domaine de la technologie enzymatique.
- Le choix du support insoluble et du type de fixation de l'enzyme visent à réaliser un compromis optimal entre plusieurs paramètres comme la stabilité chimique de la préparation, les propriétés mécaniques, la résistance à la biodégradation, le rapport surface/volume, la densité des molécules d'enzymes par unité de surface, le prix du support, la possibilité de régénération du support, etc...
- 15 Les supports insolubles généralement utilisés peuvent être classés en deux grands groupes :
- a) les supports organiques qui comprennent les polysides (cellulose et dérivés, dextranes et agarose, amidon, etc...), les protéines (collagène), les polymères synthétiques (polyaminoacides, résines polyacryliques, polyamides, etc...)
 - 20 b) les supports inorganiques (verre poreux, oxydes métalliques, alumino-silicates, etc...)
- Les supports organiques peuvent être chimiquement activés par différentes techniques, ce qui constitue l'un de leurs principaux avantages car ils permettent la fixation d'enzymes par différentes voies (inclusion, adsorption, liaison covalente,...).
- 25 Les supports inorganiques sont généralement plus stables (résistance à l'usure, aux agents chimiques et aux bactéries), mécaniquement, géométriquement et économiquement plus intéressants que les supports organiques.
- L'activation chimique des supports inorganiques est par contre une opération plus difficile, plus onéreuse et moins efficace que dans le cas des supports organiques. C'est la raison pour laquelle la fixation d'enzymes à un support inorganique se fait de préférence par adsorption. Bien que toutes les enzymes soient adsorbables, ceci n'implique pas une application générale en raison des affinités très variables entre enzymes et supports.
- 30 La présente invention a pour but de pourvoir à de nouveaux supports insolubles qui allient la stabilité des supports inorganiques à la facilité d'activation des supports organiques, qui comportent des groupes fonctionnels réactifs permettant la fixation d'autres molécules simples ou complexes, lesdits supports insolubles ayant la faculté, après fixation d'enzymes par liaison covalente par l'intermédiaire de leurs groupes fonctionnels réactifs, de former des complexes enzymatiques insolubilisés qui présentent les avantages bien connus des enzymes immobilisées et qui, de plus, sont actifs non seulement dans l'eau et en milieu aqueux, mais le sont également dans des solvants organiques non miscibles à l'eau, et pouvant être utilisées pour catalyser des réactions menées aussi bien en continu qu'en discontinu.
- 35 La présente invention a pour objet un nouveau complexe solide qui est caractérisé en ce qu'il est formé par de l'alumine liée à au moins un groupe fonctionnel phosphate d'un composé bi- ou polyfonctionnel contenant au moins un groupe fonctionnel phosphate et au moins un groupe chimiquement réactif capable de former une liaison covalente avec des molécules de nature protéique, et notamment des enzymes.
- 40 Selon un mode de réalisation préféré du nouveau complexe conforme à la présente invention, le composé bi- ou polyfonctionnel lié à l'alumine est un phosphate organique qui répond à une des formules I ou II ci-après
- 45



I



II

50

dans lesquelles R représente un groupe organique aliphatique ou aromatique comprenant au moins un groupe chimiquement réactif tel, en particulier, qu'un groupe amine primaire, aldéhyde ou acide.

55 La présente invention a également pour objet un procédé de préparation du complexe alumine-phosphate organique conforme à l'invention, qui consiste à fixer un phosphate organique qui répond à la formule I ou II ci-dessus, sur de l'alumine, par mise en contact de l'alumine et d'un phosphate organique, pendant un temps suffisant, en milieu aqueux, sensiblement à la température ambiante, à un pH compris entre 2,0 et 8,5.

Selon un mode de mise en œuvre préféré du procédé de préparation du complexe alumine-phosphate organique conforme à l'invention, le milieu dans lequel est réalisée la complexation est un milieu à force ionique élevée.

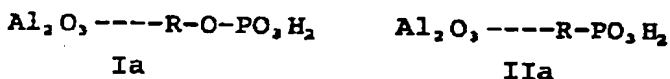
60 Les inventeurs ont pu établir, en effet, que les phosphates organiques de formules I et II se lient très fortement à l'alumine, dans l'eau, à un pH compris entre 2 et 8,5, que les complexes ainsi obtenus sont stables dans des milieux à force ionique élevée, par exemple dans NaCl 2M, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2M, et vis-à-vis de l'action des

solvants organiques, miscibles ou non miscibles à l'eau, et que les phosphates organiques de formules I et II peuvent être séparés de l'alumine par déplacement par des solutions d'autres phosphates organiques ou par des solutions d'acide phosphorique équilibrées à un pH compris entre 2 et 8,5.

La présente invention a également pour objet l'application du complexe alumine-phosphate organique conforme à l'invention en tant que support de fixation de molécules de nature protéique, et notamment d'enzymes.

Elle a en outre pour objet l'application du complexe alumine-phosphate organique conforme à l'invention en tant que moyen pour l'isolement et/ou le dosage de phosphates organiques contenus dans un milieu biologique, tels que mononucléotides, phosphoglucides, phospho-protéines, phospho-amino-acides, pyridoxal-phosphate, etc..., par liaison desdits phosphates organiques avec de l'alumine, en milieu aqueux, à un pH compris entre 2 et 8,5, et libération de ces phosphates organiques du complexe formé, par action d'une solution d'un autre phosphate organique ou d'acide phosphorique équilibrée à un pH compris entre 2,0 et 8,5.

La présente invention a également pour objet un procédé de préparation d'enzymes insolubilisées, qui consiste à former un corps complexe comprenant une enzyme liée par liaison covalente à un support solide de formule Ia ou IIa ci-après :



par réaction des groupes chimiquement réactifs que comprend le groupe organique aliphatique ou aromatique R, avec les groupes réactifs des enzymes à fixer, éventuellement activés par des activateurs appropriés.

Selon un mode de mise en oeuvre préféré de ce procédé, lorsque le complexe insoluble comprend des groupes réactifs carbonyliques tels que des groupes aldéhyde, introduits par le phosphate organique, ces groupes réactifs réagissent directement avec les fonctions amine des enzymes à fixer, en formant des bases de Schiff.

Selon une modalité avantageuse de ce mode de mise en oeuvre, les bases de Schiff obtenues sont stabilisées par réduction à l'aide d'un agent réducteur approprié, notamment du cyanoborohydrure de sodium.

Selon un autre mode de mise en oeuvre du procédé de préparation d'enzymes insolubilisées, lorsque le complexe insoluble comprend des groupes réactifs constitués par des groupes amines, ceux-ci sont activés par un activateur approprié tel qu'un réactif bifonctionnel des amines primaires pris dans le groupe qui comprend notamment le glutaraldéhyde, les diisocyanates, les diisothiocyanates, etc..., pour être rendus aptes à réagir avec les groupes amine des enzymes à fixer.

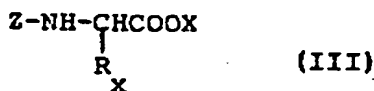
La présente invention englobe également les enzymes insolubilisées par association avec un complexe aluminophosphate organique, obtenues conformément à la présente invention.

La présente invention a en outre pour objet un procédé de catalyse de synthèses peptidiques à l'aide des enzymes insolubilisées définies dans ce qui précède, lesquelles synthèses peptidiques sont réalisées par synthèse de liaisons amidiques et peptidiques entre un composant carboxylique et un composant aminé dérivés d'acides aminés.

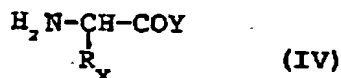
Selon un mode de mise en oeuvre préféré de ce procédé, lesdites synthèses peptidiques sont réalisées à une température comprise entre la température ambiante et 45°C environ.

Selon un mode de mise en oeuvre préféré du procédé de catalyse de synthèses peptidiques conforme à l'invention, le milieu réactionnel est exempt d'ions phosphate dont la présence pourrait provoquer la séparation du phosphate organique de l'alumine à laquelle il est lié et, par suite, la séparation de l'enzyme de son support insoluble.

Selon un autre mode de mise en oeuvre préféré du procédé de catalyse de synthèses peptidiques conforme à l'invention, celui-ci catalyse la synthèse de liaisons amidiques et peptidiques entre un dérivé d'acide aminé présentant une fonction amine bloquée et une fonction carboxylique libre ou estérifiée et un dérivé d'acide aminé présentant une fonction amine libre et une fonction carboxylique bloquée, qui répondent respectivement aux formules III et IV ci-après :



où Z représente un groupe de protection de la fonction amine ou un segment peptidique
X représente un atome d'hydrogène ou un groupe alkyle,
R_x représente la chaîne latérale d'un acide α-aminé :



où Y représente un group alcoxy, alcoylamine, ou encore un segment peptidique et R_x représente la chaîne latérale d'un acide α -aminé.

La présente invention vise plus particulièrement les nouveaux complexes alumine-phosphate organique et les nouvelles structures enzyme-complexe alumine-phosphate organique, conformes aux dispositions qui précèdent, ainsi que leurs applications, les procédés pour les préparer et les moyens mis en oeuvre pour les préparer et pour les appliquer.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre.

L'invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de préparation des complexes alumine-phosphate organiques et des enzymes insolubilisées conformes à l'invention, ainsi qu'à des exemples d'applications de ces produits.

Il doit être bien entendu, toutefois que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

EXEMPLES

Exemples 1 à 7: Préparation de complexes alumine-phosphate-organique

A 2 ml d'une solution aqueuse 10^{-2} molaire d'un phosphate organique, on additionne 1 g d'alumine, utilisée soit sous forme de poudre, soit sous forme de microbilles poreuses, préalablement équilibrée avec un solvant approprié qui sera le même au cours des réactions dans lesquelles le complexe formé sera impliqué ultérieurement, et la suspension est maintenue sous agitation pendant 10 minutes à la température ambiante. Le phosphate présent dans le surnageant est analysé quantitativement par chromatographie liquide à haute pression, par spectrophométrie U.V. ou par colorimétrie, selon le cas, et le taux de fixation à l'alumine est déterminé par différence. Pour chaque phosphate l'expérience a été menée dans différentes conditions de pH, en présence de sels et en présence de phosphates inorganiques.

Le tableau 1 qui va suivre, indique pour chaque exemple, dans la 2ème colonne, le phosphate organique mis en oeuvre, dans la 3ème colonne le pourcentage de fixation des différents phosphates sur l'alumine, et dans la 4ème colonne, le pourcentage de phosphate organique qui se fixe sur l'alumine en présence de phosphate inorganique.

TABLEAU 1

Pourcentage de fixation de phosphates organiques à l'alumine

Exemples	Phosphate	de I à V*	Phosphate 0.3 M pH 3-8.5
1	O-phosphosérine	100	0
2	O-phosphocolamine	100	1
3	Guanosine 5'-phosphate	100	2
4	Uridine 5'-phosphate	100	1.5
5	Adénosine 5'-phosphate	100	1.5
6	Acide cytidilique		
	3'-phosphate	100	1
7	Pyridoxal 5'-phosphate	100	2

* I : H_2O pH 7 ; II : NaCl 2M pH 7 ; III : CH_3COOH 0.5M ;

IV : CH_3COOH 0.5M NaCl M ; V : $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ M

Le caractère spécifique de l'inter-réaction alumine-phosphate est prouvé par des expériences comparatives avec des produits acides soit carboxyliques soit sulfonés (Tableau 2).

TABLEAU 2

	CH ₃ COOH 0.5M	CH ₃ COOH 0.5M, NaCl M	
Sérine	0	0	5
Sérine O-sulfate	40	2	
Colamine O-sulfate	35	1	10

Exemples 8 et 9 : Fixation d'une enzyme sur le complexe alumine-phosphocolamine préparé conformément à l'Exemple 2

- 1) A une solution de 60 mg de O-phosphocolamine dans 10 ml d'eau équilibrée à pH 7, on ajoute 3 g d'alumine. La suspension est maintenue à pH 7 sous légère agitation. Après 30 minutes, la phosphocolamine est totalement fixée sur l'alumine qui est récupérée par filtration ou centrifugation. 15
 - 2) L'agrégat alumine-phosphocolamine est suspendu dans 10 ml d'eau et traité avec 4 ml d'une solution de glutaraldéhyde à 25 % dans l'eau. La suspension est équilibrée à pH 7 dans l'eau et maintenue sous légère agitation pendant 30 minutes. L'alumine ainsi activée est à nouveau séparée et lavée à l'eau. 20
 - 3) 50 mg d'enzyme sont dissous dans 10 ml d'eau dans lesquels on ajoute la complexe alumine-phosphocolamine activé comme décrit en 2). La suspension est maintenue à pH 7 sous légère agitation pendant 30 minutes. L'enzyme insolubilisée est récupérée par essorage et lavée à l'eau jusqu'à disparition complète de l'activité enzymatique dans l'eau de lavage. 25
- Toutes les opérations décrites ont été menées à température ambiante.
- On obtient 4,5 g d'enzyme immobilisée (soit 0,5 g d'eau par g. d'alumine de départ). L'activité de l'enzyme immobilisée est déterminée à l'aide de substrats spécifiques comme décrit dans le Tableau 3 qui va suivre.
- Un tiers de la préparation est suspendu dans 20 ml de NaCl 1 M et maintenu sous agitation à pH 7 pendant 24 heures. La phase solide est récupérée par essorage, lavée à l'eau et l'activité enzymatique déterminée à nouveau. 30

TABLEAU 3

Activité des préparations d'enzymes insolubilisées (u/g)

Exemple	Enzyme	substrat	préparation après traitement	
			fraîche	avec NaCl 1M
8	Trypsine	Bz-ArgOEt	62,5	63
9	α -chymotrypsine	Ac.TyroEt	74	74

Exemple 10 : Fixation d'une enzyme sur le complexe alumine-pyridoxal 5'-phosphate préparé conformément à l'exemple 7

- 1) A une solution de 20 mg de pyridoxal 5'-phosphate dans 10 ml d'eau, on ajoute 3 g d'alumine et la suspension est maintenue à pH 7 sous légère agitation. Après fixation complète du pyridoxal 5'-phosphate sur l'alumine, la phase solide, devenue jaune, est séparée par essorage et lavée à l'eau. 50
- 2) Une solution de 60 mg de trypsine dans 10 ml d'eau est ajoutée au complexe alumine-pyridoxal 5'-phosphate et la suspension maintenue sous agitation à pH 7 et à température ambiante. Après 30 minutes, 30 mg de cyanoborohydrure de sodium sont ajoutés à la suspension qui est maintenue sous agitation pendant 30 minutes supplémentaires à pH 7. Pendant ce temps la couleur de la suspension vire du jaune au blanc. La trypsine immobilisée est récupérée par essorage et lavée abondamment à l'eau. On obtient 4,5 g de trypsine immobilisée. Après avoir déterminé l'activité enzymatique, une partie de la préparation est mise en suspension dans un excès de NaCl 1M dans l'eau pendant 24 h sous légère agitation. On détermine l'activité enzymatique sur la phase solide séparée par filtration et lavée à l'eau. 55

TABLEAU 4

Activité de la préparation d'enzyme insolubilisée (u/g)

Exemple	Enzyme	substrat	préparation après traitement	
			fraîche	avec NaCl 1M
10	trypsine	Bz ArgOEt	73	73

Exemples 11 à 17 : Synthèse peptidique par catalyse enzymatique

Dans une expérience type, 1 g de chymotrypsine immobilisée comme décrit dans l'exemple 9, est suspendu dans 2 ml de solvant organique (voir Tableau 5) contenant 10^{-4} moles d'ester méthylique d'acétyl-L-tryptophane comme composant carboxylique et 10^{-3} moles d'ester méthylique de la glycine comme composant aminé. La suspension est maintenue sous légère agitation pendant 2 h à 20°C. L'acétyl-L-tryptophanyl-glycine ester formé est analysé quantitativement par chromatographie liquide haute pression à l'aide d'un étalon synthétisé par voie chimique. De manière identique d'autres composants carboxyliques et aminés ont été condensés par catalyse chymotrypsique et les résultats sont donnés dans le Tableau 5.

TABLEAU 5

Exemple n°	Composé carboxylique	Composé aminé	Acétate d'éthyle	1,2-dichloro éthane
11	Ac.L.TrpOMe	GlyOMe	52	49
12	"	benzylamine	60	58
13	Ac.L.PheOMe	GlyOMe	60	60
14	"	benzylamine	65	70
15	Z.L.Ala.L.TrpOMe	GlyOMe	43	38
16	Z.L.Ala.L.TrpOMe	benzylamine	45	46
17	For.L.TrpOMe	L.LeuL.AspL.PheNH ₂	58	55*

* Rendement déterminé par voie biologique. Le produit For.TrpLeuAspPheNH₂ (formyl-tétragastrine) est un agent de sécrétion gastrique acide.

Exemple 18 : Utilisation répétitive d' α -chymotrypsine en phase organique

1 g d' α -chymotrypsine immobilisée comme décrit dans l'exemple 9 sont suspendus dans 2 ml de 1,2 dichloroéthane contenant 10^{-4} moles d'Ac.L.TrpOMe et 10^{-3} moles de benzylamine. La suspension est placée dans un réacteur en verre muni d'une jaquette à circulation d'eau et fermé en haut et en bas par deux bouchons munis de filtres et de robinets. Après 2 h de réaction à 20°C, le solvant est séparé par filtration à l'aide d'une pression d'azote. L'acétyl-L-Trp benzylamide formé est analysé quantitativement sur un aliquot, par chromatographie liquide haute pression. L'enzyme immobilisée est lavée au dichloroéthane contenant 5 % d'eau et utilisée pour un deuxième cycle dans les mêmes conditions que pour le premier cycle. Les rendements de synthèse à chaque cycle sont donnés dans le Tableau 6 ci-après.

TABLEAU 6

Exemple	cycle n°	1	2	3	4	5	6	7	8
18	synthèse %	58	59	58	58	60	62	65	65

La légère augmentation du rendement peut provenir de la récupération du produit adsorbé au cours des premiers cycles.

Exemples 19 et 20 : Thermolysine insolubilisée en synthèse peptidique

1) 3 g d'alumine sont complexés avec la O-phosphocolamine et activés par le glutaraldéhyde comme décrit précédemment (Ex. 8 et 9) et ajoutés à 10 ml d'une solution 3.10^{-2} M d'acétate de calcium contenant 50 mg de thermolysine. La suspension est maintenue 30 minutes sous légère agitation à température ambiante et à pH 7. L'analyse spectrale du surnageant montre que la totalité de l'enzyme a été fixée. La thermolysine ainsi immobilisée est lavée avec une solution 3.10^{-2} M d'acétate de calcium et récupérée par essorage. On obtient 4,5 g de thermolysine immobilisée.

2) 4.10^{-4} moles d'acide N-carbobenzoxyl-L-aspartique (Z.L-Asp) et $0.8.10^{-3}$ moles d'ester méthylique de la L-phénylalanine (L-PheOMe) sont dissous dans 4 ml d'eau à pH 8 et à cette solution on ajoute encore 1 g de thermolysine immobilisée. La suspension est maintenue sous légère agitation à pH 8 et à 40° C pendant 10 h. Un produit solide précipite en se mélangeant à l'enzyme immobilisée. Après acidification à pH 5 avec de l'acide acétique, 4 ml de n-butanol sont ajoutés à la suspension. Le produit solide formé au cours de la réaction passe en solution. L'enzyme immobilisée est séparée par filtration, rééquilibrée dans une solution d'acétate de calcium 3.10^{-2} M à pH 8 et utilisée pour les cycles suivants. Les deux phases liquides sont séparées et un aliquot de la phase organique analysé par chromatographie liquide haute pression. Le rendement en Z.L-Asp-L-PheOMe est déterminé à l'aide d'un étalon préparé chimiquement.

La condensation entre Z.L-Trp et L-LeuOMe a été conduite de manière analogue.

TABLEAU 7

Exemple	Composé carboxylique	Composé aminé	Synthèse %	
			I cycle	II cycle
19	Z.Asap	L.PheOMe	60	58
20	Z.L.Trp	L.LeuOMe	100	100

Exemples 21 et 22 : Séparation chromatographique de phosphates organiques

1) Une colonne en verre ($l = 3$ cm, $\varnothing = 0,7$ cm) est remplie de poudre d'alumine et équilibrée avec une solution 0,2M de NaCl dans l'eau ajustée à pH 3 avec HCl.

2) Un mélange d'Adénosine (10^{-5} moles) et Adénosine-5'-phosphate (10^{-5} moles) est introduit en haut de la colonne qui est éluée avec une solution 0,2M de NaCl à pH 3. Le débit est de 18 ml/heure et l'effluent est collecté en fraction de 0,6 ml.

3) Après un volume de 18 ml, on ajoute à l'éluant de l'acide phosphorique pour avoir une concentration de 2 %, et on équilibre à pH 3 avec NH_4OH . On continue l'éluion et le fractionnement.

L'analyse des différentes fractions a donné les résultats présentés dans le Tableau 8 ci-dessous. Un mélange de Sérine, Sérine-O-sulfate et Sérine-O-phosphate a été séparé chromatographiquement de manière analogue. Les résultats sont réunis dans le Tableau 9 ci-après.

TABLEAU 8

Isolement chromatographique de l'Adénosine-5'-phosphate

Exemple 21

	Composé	Effluent	N° Fraction	Rendement de récupération
10	Adénosine	NaCl 0,2M pH 3	2 - 6	95%
15	Adénosine-5'-phosphate	NaCl 0,2M H ₃ PO ₄ 2% pH 3	34 - 40	92%

TABLEAU 9

Isolement chromatographique de la Sérine-0-phosphate

Exemple 22

	Composé	Effluent	N° Fraction	Rendement de récupération
25	Sérine	NaCl 0,2M pH 3	1 - 3	94%
30	Sérine-0-Sulfate	NaCl 0,2M, pH 3	4 - 8	96%
35	Sérine-0-Phosphate	NaCl 0,2M H ₃ PO ₄ 2% pH 3	35 - 39	91%

Les enzymes insolubilisées conformes à la présente invention peuvent être utilisées en tant que catalyseurs de synthèse peptidiques aussi bien dans des procédés en discontinu (dans des réacteurs du type batch ou sur colonnes) que dans des procédés en continu.

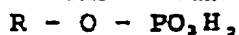
Du fait qu'elles sont disponibles sous forme de poudres, elles sont aisément manipulables, leurs conditions de mise en oeuvre sont simples et elles procurent des rendements économiquement intéressants pour la production de composés, comme les peptides, qui présentent un intérêt croissant dans le domaine des médicaments, et qui sont, dans certains cas, plus faciles à préparer par catalyse enzymatique que par voie chimique, et ceci sans le risque d'une racémisation préjudiciable à leur activité.

Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en oeuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarter du cadre, ni de la portée de la présente invention.

Revendications

1. Nouveau complexe solide qui est caractérisé en ce qu'il est formé par de l'alumine liée à au moins un groupe fonctionnel phosphate d'un composé bi- ou polyfonctionnel contenant au moins un groupe fonctionnel phosphate et au moins un groupe chimiquement réactif capable de former une liaison covalente avec des molécules de nature protéique, et notamment des enzymes.

2. Complexe selon la Revendication 1. caractérisé en ce que le composé bi- ou polyfonctionnel lié à l'alumine est un phosphate organique qui répond à l'une des formules I ou II ci-après :



I



II

5

dans lesquelles R représente un groupe organique aliphatique ou aromatique comprenant au moins un groupe chimiquement réactif tel, en particulier, qu'un groupe amine primaire, aldéhyde ou acide.

3. Procédé de préparation du complexe selon l'une quelconque des Revendications 1 ou 2, caractérisé en ce qu'il consiste à fixer un phosphate organique qui répond à la formule I ou II selon la Revendication 2, sur de l'alumine, par mise en contact de l'alumine et d'un phosphate organique, pendant un temps suffisant, en milieu aqueux, sensiblement à la température ambiante, à un pH compris entre 2,0 et 8,5.

10

4. Procédé selon la Revendication 3, caractérisé en ce que le milieu dans lequel est réalisée la complexation est un milieu à force ionique élevée.

15

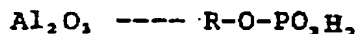
5. Application du complexe selon l'une quelconque des Revendications 1 ou 2 en tant que support de fixation de molécules de nature protéique, et notamment d'enzymes.

6. Application du complexe selon l'une quelconque des Revendications 1 ou 2 en tant que moyen pour l'isolement et/ou le dosage de phosphates organiques contenus dans un milieu biologique tels que mononucléotides, phosphoglucides, phospho-protéines, phospho-amino-acides, pyridoxal-phosphate, etc... par liaison desdits phosphates organiques avec de l'alumine, en milieu aqueux, à un pH compris entre 2 et 8,5, et libération de ces phosphates organiques du complexe formé, par action d'une solution de phosphate inorganique ou d'acide phosphorique équilibrée à un pH compris entre 2,0 et 8,5.

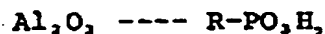
20

7. Procédé de préparation d'enzymes insolubilisées, caractérisé en ce qu'il consiste à former un corps complexe comprenant une enzyme liée par liaison covalente à un support solide de formule Ia ou IIa ci-après :

25



Ia



IIa

30

par réaction des groupes chimiquement réactifs qui comprend le groupe organique aliphatique ou aromatique R, avec les groupes réactifs des enzymes à fixer, éventuellement activés par des activateurs appropriés.

35

8. Procédé selon la Revendication 7, caractérisé en ce que lorsque le complexe insoluble comprend des groupes réactifs carbonyliques tels que des groupes aldéhyde, introduits par le phosphate organique, ces groupes réactifs réagissent directement avec les fonctions amine des enzymes à fixer, en formant des bases de Schiff.

9. Procédé selon la Revendication 8, caractérisé en ce que les bases de Schiff obtenues sont stabilisées par réduction à l'aide d'un agent réducteur approprié, notamment du cyanoborohydrure de sodium.

40

10. Procédé selon la Revendication 7, caractérisé en ce que lorsque le complexe insoluble comprend des groupes réactifs constitués par des groupes amine, ceux-ci sont activés par un activateur approprié tel qu'un réactif bifonctionnel des amines primaires pris dans le groupe qui comprend notamment le glutaraldéhyde, les diisocyanates, les diisothiocyanates, etc..., pour être rendus aptes à réagir avec les groupes amine des enzymes à fixer.

45

11. A titre de produits industriels nouveaux, des enzymes insolubilisées par association avec un complexe alumine-phosphate organique, obtenues en mettant en oeuvre le procédé selon l'une quelconque des Revendications 7 à 10.

50

12. Procédé de catalyse de synthèses peptidiques caractérisé par la mise en oeuvre en tant que catalyseur enzymatique, d'au moins une enzyme insolubilisée conforme à la Revendication 11.

13. Procédé selon la Revendication 12, caractérisé en ce que lesdites synthèses peptidiques sont réalisées à une température comprise entre la température ambiante et 45°C environ.

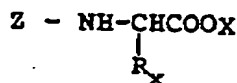
14. Procédé selon l'une quelconque des Revendications 12 ou 13, caractérisé en ce que le milieu réactionnel est exempt d'ions phosphate dont la présence pourrait provoquer la séparation de l'enzyme et de son support.

55

15. Procédé selon l'une quelconque des Revendications 12 à 14, caractérisé en ce que les enzymes insolubilisées catalysent la synthèse de liaisons amidiques et peptidiques entre un dérivé d'acide aminé présentant une fonction amine bloquée et une fonction carboxylique libre ou estérifiée et un dérivé d'acide aminé présentant une fonction amine libre et une fonction carboxylique bloquée, qui répondent respectivement aux formules III et IV ci-après.

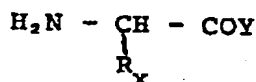
60

65



(III)

où Z représente un groupe de protection de la fonction amine ou un segment peptidique.
X représente un atome d'hydrogène ou un groupe alkyle
R_x représente la chaîne latérale d'un acide α-aminé ;



(IV)

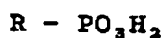
où Y représente un groupe alcoxy ou alcoylamine, ou encore un segment peptidique et
R_x représente la chaîne latérale d'un acide α-aminé.

Claims for Austria

1. Procédé de préparation du complexe solide formé par de l'alumine liée à au moins un groupe fonctionnel phosphate d'un composé bi- ou polyfonctionnel contenant au moins un groupe fonctionnel phosphate et au moins un groupe chimiquement réactif capable de former une liaison covalente avec des molécules de nature protéique, et notamment des enzymes, caractérisé en ce qu'il consiste à fixer un phosphate organique qui répond à la formule I ou II ci-après :



(I)



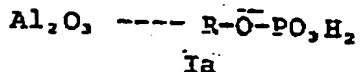
(II)

dans lesquelles :

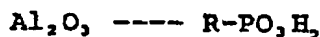
R représente un groupe organique aliphatique ou aromatique comprenant au moins un groupe chimiquement réactif tel, en particulier, qu'un groupe amine primaire, aldéhyde ou acide, sur de l'alumine, par mise en contact de l'alumine et d'un phosphate organique, pendant un temps suffisant, en milieu aqueux, sensiblement à la température ambiante, à un pH compris entre 2,0 et 8,5.

2. procédé selon la Revendication 1. caractérisé en ce que le milieu dans lequel est réalisée la complexation est un milieu à force ionique élevée.

3. Procédé de préparation d'enzymes insolubilisées, caractérisé en ce qu'il consiste à former un corps complexe comprenant une enzyme liée par liaison covalente à un support solide de formule Ia ou IIa ci-après :



Ia



IIa

per réaction des groupes chimiquement réactifs qui comprend le groupe organique aliphatique ou aromatique R. avec les groupes réactifs des enzymes à fixer, éventuellement activés par des activateurs appropriés.

4. Procédé selon la Revendication 3, caractérisé en ce que lorsque le complexe insoluble comprend des groupes réactifs carbonyles tels que des groupes aldéhyde, introduits par le phosphate organique, ces groupes réactifs réagissent directement avec les fonctions amine des enzymes à fixer, en formant des bases de Schiff.

5. Procédé selon la Revendication 4, caractérisé en ce que les bases de Schiff obtenues sont stabilisées par réduction à l'aide d'un agent réducteur approprié, notamment du cyanoborohydrure de sodium.

6. Procédé selon la Revendication 3, caractérisé en ce que lorsque le complexe insoluble comprend des groupes réactifs constitués par des groupes amine, ceux-ci sont activés par un activateur approprié tel qu'un réactif bifonctionnel des amines primaires pris dans le groupe qui comprend notamment le glutaraldéhyde, les diisocyanates, les diisothiocyanates, etc..., pour être rendus aptes à réagir avec les groupes amines des enzymes à fixer.

7. Procédé de catalyse de synthèse peptidique caractérisé par la mise en oeuvre en tant que catalyseur enzymatique, d'au moins une enzyme insolubilisée par association avec un complexe alumine-phosphate organique, obtenue en mettant en oeuvre le procédé selon l'une quelconque des Revendications 3 à 6.

8. Procédé selon la Revendication 7. caractérisé en ce que lesdites synthèses peptidiques sont

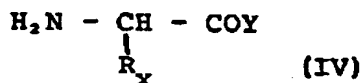
réalisées à une température comprise entre la température ambiante et 45°C environ.

9. Procédé selon l'une quelconque des Revendications 7 ou 8, caractérisé en ce que le milieu réactionnel est exempt d'ions phosphate dont la présence pourrait provoquer la séparation de l'enzyme et de son support.

10. Procédé selon l'une quelconque des Revendications 7 à 9, caractérisé en ce que les enzymes insolubilisées catalysent la synthèse de liaisons amidiques et peptidiques entre un dérivé d'acide aminé présentant une fonction amine bloquée et une fonction carboxylique libre ou estérifiée et un dérivé d'acide aminé présentant une fonction amine libre et une fonction carboxylique bloquée, qui répondent respectivement aux formules III et IV ci-après :



où Z représente un groupe de protection de la fonction amine ou un segment peptidique.
X représente un atome d'hydrogène ou un groupe alkyle
R_x représente la chaîne latérale d'un acide α-aminé ;



où Y représente un groupe alcoxy ou alcoylamine, ou encore un segment peptidique et
R_x représente la chaîne latérale d'un acide α-aminé.

11. Application du complexe selon la Revendication 1, en tant que support de fixation de molécules de nature protéique, et notamment d'enzymes.

12. Application du complexe selon la Revendication 1, en tant que moyen pour l'isolement et/ou le dosage de phosphates organiques contenus dans un milieu biologique tels que mononucléotides, phosphoglucides, phospho-protéines, phospho-amino-acides, pyridoxal-phosphate, etc... par liaison desdits phosphates organiques avec de l'alumine, en milieu aqueux, à un pH compris entre 2 et 8,5, et libération de ces phosphates organiques du complexe formé, par action d'une solution de phosphate inorganique ou d'acide phosphorique équilibrée à un pH compris entre 2,0 et 8,5.



Office européen
des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

Numero de la demande

EP 86 40 2014

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl. 4)
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 81, no. 11, 16 septembre 1974, page 187, résumé no. 60071f, Columbus, Ohio, US; C.R. LOWE et al.: "Affinity chromatography on immobilized adenosine 5'-monophosphate. Some kinetic parameters involved in the binding of group-specific enzymes", & EUR. J. BIOCHEM. 1974, 42(1), 1-6 * Résumé *		C 07 F 9/09 C 07 F 9/58 C 07 H 19/06 C 07 H 19/16 C 12 N 11/02 C 12 N 11/14
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl. 4)
			C 07 F 9/00 C 07 H 19/00 C 12 N 11/00
Le présent rapport de recherche a été établi pour toutes les revendications			
Lieu de la recherche LA HAYE		Date d'achèvement de la recherche 17-12-1986	Examineur BESLIER L.M.
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES			
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	